IZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

A1



PCT Oficina Internacional SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes 6:

C07K 14/16, C12N 1/19, 15/09, 15/10, 15/18, 15/63, 15/64, 15/65, 15/67, 15/81, C12P 1/02, 21/02

(11) Número de publicación internacional:

WO 98/20035

(43) Fecha de publicación internacional:

14 de Mayo de 1998 (14.05.98)

(21) Solicitud internacional:

PCT/MX97/00033

(22) Fecha de la presentación internacional:

24 de Octubre de 1997 (24.10.97)

(30) Datos relativos a la prioridad:

965082

24 de Octubre de 1996 (24.10.96)

MX

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNI-VERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON [MX/MX]; Torre de Rectoría 4º Piso, Depto. Jurídico, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. 66451 (MX).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): GUERRERO OLAZARAN, Martha [MX/MX]; Plaza Mariscala 30, Colonia Cd. Satélite, Monterrey, N.L. 64960 (MX). BARRERA SALDAÑA, Hugo [MX/MX]; Camino de las Alondras 240, Fracc. San Jemo 3er. sector, Monterrey, N.L. 64630 (MX). VIADER SALVADO, José María [ES/MX]; Plaza Mariscala 30, Colonia Cd. Satélite, Monterrey, N.L. 64960 (MX).

(74) Mandatario: CHAPA LEAL, José Guadalupe; Torre de Rectoría 4º Piso, Depto. Jurídico, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. 66451 (MX).

(81) Estados designados: JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publicada

Con informe de búsqueda internacional.

Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.

Con una indicación relativa a un microorganismo depositado, presentada de conformidad con lo dispuesto en la Regla 13bisi, separadamente, y no con la descripción. Fecha de la recepción en la Oficina Internacional: 09 de Febrero de 1998 (09.02.1998)

(54) Title: MODIFIED METHYLOTROPHIC P. PASTORIS YEAST WHICH SECRETES HUMAN GROTH HORMONE

(54) Título: LEVADURA METILOTROFICA MODIFICADA DE P. PASTORIS DE SECRECION DE HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANO

(57) Abstract

The present invention relates to an expression system which has been developed for the production and secretion of human growth hormone (HGH) in its natural and biologically active form, wherein is used as host organism a methylotrophic yeast such as Pichia pastoris. The methylotrophic yeast has been transformed with at least a copy of a functional sequence of cDNA which codes for HGH which is functionally associated with a second DNA sequence which codes for the pre-pro sequence of the alpha factor of S. cerevisiae (including the proteolytic processing site: lys-arg), and wherein both DNA sequences are regulated by a promotor of a gene of a methylotrophic yeast, said gene being inducible with methanol. Methylotrophic yeasts containing in their genome at least one copy of said DNA sequence can efficiently produce and secrete mature HGH, appropriately processed and biologically active to the culture medium.

(57) Resumen

En la presente invención se ha desarrollado un sistema de expresión adecuado para la producción y secreción de hormona de crecimiento humano (HGH) en su forma natural y biológicamente activa, en el cual se emplea como organismo hospedero una levadura metilotrófica, tal como Pichia pastoris. En donde la presente invención comprende una levadura metilotrófica transformada con al menos una copia de una secuencia funcional del ADNc que codifica para HGH, la cual está funcionamente associada con una segunda secuencia de ADN que codifica para la secuencia pre-pro del factor alfa de S. cerevisiae (incluyendo el sitio de procesamiento proteolítico: lys-arg), y en donde ambas secuencias de ADN se encuentran bajo la regulación de un promotor de un gen de una levadura metilotrófica, el cual es inducible con metanol. Levaduras metilotróficas conteniendo en su genoma al menos una copia de esta secuencia de ADN producen y secretan de forma eficiente HGH madura, correctamente procesada y biológicamente activa hacia el medio de cultivo.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
ΑÜ	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
ΑZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	ExRepública Yugoslava de	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turqufa
BG	Bulgaria	HU	Hungria	ML	Malí	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belanis	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelandia		
CM	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		

10

15

20

25

30

35





LEVADURA METILOTROFICA MODIFICADA DE P. PASTORIS DE SECRECION DE HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANO

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION.

La presente invención se relaciona con el área biofarmacéutica, particularmente con la producción de la hormona del crecimiento humano (HGH por sus siglas en inglés) que se ha usado exitosamente en el tratamiento de diversos problemas de salud. Mas específicamente se relaciona con el uso de tecnología del ADN recombinante para la producción de hormonas recombinantes del crecimiento humano (HGHr) en levaduras metilotróficas transformadas con la secuencia del ADNc de HGH madura y la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae*, y que bajo la regulación de una región promotora inducible con metanol de un gene de levadura metilotrófica y cultivada bajo ciertas condiciones, permiten la expresión y secreción de HGHr hacia el medio de cultivo. La invención también se relaciona con dichas levaduras metilotróficas, los fragmentos de DNA y los vectores usados en dicha transformación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION.

Los problemas en los que actualmente se utiliza HGH como parte de la terapia son: tratamiento del enanismo hipofisiario (causado por mal funcionamiento de la hipófisis); remoción de ácidos grasos y por ende en el tratamiento de la obesidad; mejora de la vascularización; promoción de la ganancia de masa muscular en ancianos; en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas, y en la aceleración de la regeneración de tejidos dañados.

La hormona del crecimiento humano (HGH) o somatrotropina es un polipéptido globular de 191 aminoácidos sin residuos de azúcares, con un peso molecular aproximado de 22kDa. Tomando en cuenta el modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcino, se considera que la HGH está constituida por 4 hélices alfa antiparalelas. La molécula presenta dos enlaces disulfuro que conectan la hélice 4 con el extremo carboxilo terminal de la proteína y la hélice 1 con la 4 (Devos *et al.* 1992).

La producción de HGHzaq en la hipófisis es episódica y está regida por la acción de dos hormonas hipotalámicas, el factor liberador de la hormona del crecimiento y la somatostatina. Mientras que el primero estimula su síntesis, la segunda inhibe su liberación. La hormona actúa directamente sobre las células del tejido blanco, o a tráves de intermediarios de tipo hormonal, llamados somatomedinas (Daughaday, 1985), los efectos catabólicos de la HGH incluyen: incremento de la lipólisis, oxidación de los ácidos grasos y transporte disminuído de glucosa, con la consecuente elevación de la concentración de glucosa en sangre (Daughaday, 1985). Los efectos anabólicos incluyen: incremento en el transporte de aminoácidos con

10

15

20

25

30

35



disminución de su catabolismo y estimulación de la síntesis de ADN, ARN y proteínas a nivel hepático (Campbell, 1988). En término generales, se considera que el efecto neto de HGH y de las somatomedinas es anabólico (Welsh, 1985). Entre las funciones importantes de la HGH se encuentra su participación en el crecimiento post-natal.

La importancia de la HGH y su aplicación en el área biofarmacéutica se refleja en los usos que ha tenido, ha sido utilizada de forma exitosa en el tratamiento del enanismo hipofisiario, remueve ácidos grasos y por ello es empleada en el tratamiento de obesidad, mejora la vascularización y promueve la ganancia de masa muscular en ancianos; es usada en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas y acelera la regeneración de tejidos dañados (Watson, 1991).

La HGH recombinante fue sintetizada por primera vez en Escherichia coli (E. coli) (2.4 mg/L de medio cultivo) por Goeddel y colaboradores en 1979 bajo el control del promotor lac (Goeddel et al, 1979). La secreción al periplasma de la bacteria fue lograda por Gray y cols en 1985, cuya estrategia consistió en utilizar el ADNc de HGH en fusión con la región que codifica para el péptido señal del gen de la fosfatasa alcalina de E. coli, logrando producir 0.28 mg/L de la hormona, de los cuales el 82% se dirigió hacia el espacio periplásmico (Gray, *et al*, 1985). Becker y Hsiung en 1986 alcanzaron una concentración de 15 mg/L de HGH en el espacio periplásmico gracias al péptido señal de la proteína de la membrana externa (OMP) de E. coli, Chang y cols en 1987, al fusionar el ADNc de HGH a la región que codifica para el péptido señal de la enterotoxina II de E. coli, utilizando el promotor de la fosfatasa alcalina de esta misma bacteria, produjeron 15.4mg/L de HGH, de los cuales el 90% se exportó al periplasma. Kato y cols. en 1987 reportaron la síntesis de HGH y su secreción al medio de cultivo, mediante el uso de un plásmido híbrido kill-HGH. El gen kill expresa una proteína que permeabilizaba la membrana externa. La concentración de HGH que se alcanzó fue de 20.5 mg/L de los cuales 11.2mg/L se secretaron al medio y 8.6mg/L permanecieron en el periplasma. Hsiung y cols, en 1989 usaron la proteína liberadora de bacteriocina para permitir que la HGH recombinante, la cual había sido secretada al periplasma gracias a la presencia del péptido señal de OMP, fuera secretada al medio de cultivo con una concentración de hasta 69.6 mg/L. Además de en E. coli, la HGH recombinante ha sido producida también en B. subtilis, S. cerevisiae y células de mamíferos, sin embargo la síntesis de HGH recombinante en estas últimas ha resultados con rendimientos muy bajos (del orden de μg/L) (Ortíz-López, 1992; y Pavlakis *et al*, 1991).

Las levaduras pueden ofrecer ventajas sobre las bacterias en la producción de proteínas heterólogas, ya que a pesar de ser organismos unicelulares de fácil manipulación y crecimiento rápido, su organización celular es eucariótica, permitiendo la realización de

10

15

20

25

30

35



procesos de expresión y maduración característicos de células animales y vegetales. Además, pueden secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo, siendo los niveles del producto recombinante más altos en este último que en el citoplasma. Aún más, los productos secretados son obtenidos con alto grado de pureza (pues pocas proteínas endógenas son secretadas) y por consiguiente las etapas de purificación se reducen. Finalmente, ofrecen un ambiente apto para el plegamiento adecuado de proteínas sobre todo de aquellas que contienen enlaces de disulfuro.

Pichia pastoris es una levadura capaz de metabolizar metanol como única fuente de carbono y energía (metilotrófica) y es empleada actualmente para la producción de proteínas recombinantes, debido a que como sistema de producción es mas sencillo, barato y rendidor que otros sistemas de eucariotes superiores. Al ser una levadura comparte las ventajas de fácil manipulación genética y bioquímica con *S. cerevisiae* pero supera a ésta en los niveles de producción de proteínas heterólogas (10 a 100 veces mayores) (Cregg et al, 1993; y Romanos, 1995). Además se han desarrollado sistemas de expresión en *P. pastoris* que superan los problemas asociados con *S. cerevisiae*, tales como aumentar el número de copias y la estabilidad del mismo al momento del escalamiento. Este sistema se caracteriza por el empleo de un promotor que conduce la expresión del gen heterólogo. Este promotor es derivado de un gen de la levadura inducible con metanol y sujeto a una regulación precisa, conduciendo con frecuencia a altos niveles de expresión del gen heterólogo.

P. pastoris ha sido usada en la producción de varias proteínas heterólogas, porejemplo el antígeno de superficie de la hepatitis B (Cregg, et al, 1987), lisozima e invertasa (Digan, 1988; Tschopp, 1987), factor de necrosis tumoral (Sreekrishna, 1989), entre otras. Sin embargo esfuerzos para producir otros productos de genes heterólogos en Pichia pastoris, especialmente vía secreción, han dado resultados variables, así se tienen ejemplos de bajos rendimientos, han dado resultados variables, así se tienen ejemplos de bajos rendimientos, proteólisis de la proteína secretada, ineficiente secreción y en algunos casos no se ha detectado el producto protéico (Romanos, 1995). Con los estudios que se tienen hasta el momento al respecto, es difícil predecir si una proteína en particular será sintetizada y/o secretada en una levadura metilotrófica o si ésta tolerará la presencia de la proteína heteróloga producida; de la misma manera, también es difícil predecir si estos procesos serán eficientes.

Considerando 1) que los niveles de producción de una proteína recombinante en cultivo a nivel matraz no reflejan con precisión los niveles de producción observados a nivel fermentador; 2) que de acuerdo a la literatura referida a *P. pastoris*, estos niveles se elevan considerablemente cuando *P. pastoris* se cultiva a gran escala, 3) la disponibilidad de tecnología sobre fermentaciones a altas densidades celulares para *P. pastoris*, y 4) los altos

10

15

20

25



niveles de producción y eficiente secreción de HGH recombinante que caracteriza sorprendentemente al sistema e expresión descrito por primera vez en la presente invención, el desarrollo biotecnológico aquí aportado, ofrece importantes ventajas tecnológicas y económicas para la producción de HGH recombinante.

-4-

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1. Representación esquemática del corte preparativo del vector pJT. Presentando la estructura de pJT con sus elementos mas importantes y los productos obtenidos después de la digestión con las enzimas Xba I-Sma I.

FIGURA 2. Representación esquemática del corte preparativo del vector de expresión pPIC9 de *Pichia pastoris*. Se representa la estructura de pPIC9 con sus elementos más importantes y los productos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas *Xho I y Sna BI*.

FIGURA 3. Estructura del plásmido de expresión pPIC9hGH22K. El plásmido pPIC9hGH22k (A) que contiene la secuencia que codifica para la HGH madura en los sitios Xho I - Sna BI entre el promotor AOX1 (5' AOX1) y el terminador AOX1-t). Las dos formas de integración cromosómica que se obtienen son; (B) integración del vector en HIS4, (C) integración del vector en AOX1.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, el polipéptido de HGH puede ser producido por células de levadura metilotrófica que contiene en su genoma al menos una copia de la secuencia de ADNc que codifica para HGH asociada de forma funcional con la secuencia del ADN codificante para la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* (incluyendo el sitio del procesamiento proteolítico: lys-arg) y bajo la regulación de una región promotora de un gene de una levadura metilotrófica inducible con metanol.

El producto polipeptídico producido de acuerdo con la presente invención es secretado en el medio de cultivo en alta concentración; además el sistema de expresión inventado condujo excelentes resultados debido al hecho de que la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* funciona adecuadamente para dirigir la secreción de HGH en levaduras metilotróficas. El término "secuencia de ADN codificante de HGH funcionalmente operable" usado en la presente descripción, incluye la siguiente secuencia de ADNc que codifica para el polipéptido de HGH:

Met ala thr gly ser arg thr ser leu leu leu ala phe gly leu leu cys leu pro trp

-25

-20

-15

-10

leu gln glu gly ser ala phe pro thr ile pro leu ser arg leu phe asp asn ala met

30



-5 leu arg ala his arg leu his gln leu ala phe asp thr tyr gln glu phe glu glu ala tyr ile pro lys glu gln lys tyr ser phe leu gln asn pro gln thr ser leu cys phe ser glu ser ile pro thr pro ser asn arg glu glu thr gln gln lys ser asn leu glu leu leu arg ile ser leu leu leu ile gln ser cys ala gly ala val gln phe leu arg ser val phe ala asn ser leu val tyr gly ala ser asp ser asn val tyr asp leu leu lys asp leu glu glu gly ile gln thr leu met gly arg leu glu asp gly ser pro arg thr gly gln ile phe lys gln thr tyr ser lys phe asp thr asn ser his asn asp asp ala leu leu lys asn tyr gly leu leu tyr cys phe arg lys asp met asp lys vl glu thr phe leu arg ile val gln cys arg ser val glu gly ser cys gly phe AMB

Esta secuencia es conocida en el estado de la técnica y puede obtenerse por retrotranscripción del ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc) de HGH y convirtiendo éste último en doble cadena de ADNc. La secuencia de ADN de HGH requerida puede también ser removida, por ejemplo, con enzimas de restricción de vectores conocidos conteniendo la secuencia del gen ó el ADNc de HGH; ejemplo de tales vectores y las formas para su preparación pueden ser tomadas de varias publicaciones, entre ellas Goeddel (1979), Gay et al (1985), Becker y Hsiung (1986), Chang et al (1987), Kato et al (1987), Hsiung et al (1989), Ortíz-López (1992) y Pavlakis et al (1991).

La secuencia nucleotídica que codifica para la HGH madura de preferencia a usar de acuerdo con la presente invención se presenta subrayada a continuación. Las letras negritas y mayúsculas se señalan el sitio Xba I, creado por mutagénesis, y las letras negritas y minúsculas el sitio Sma I natural de la región 3'no traducible de ésta.

ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCCTGG	
CTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTATCTAGACTTTTTGACAACGCTATG	
CTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCC	



PCT/MX97/00033

TCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAGAAATCCAACCTAGAG 300 CTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGCGCTGGAGCCGTGCAGTTCCTCAGG 360 AGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTA 420 AAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGG 480 ACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACACAACGATGAC 540 600 ACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCtgccc 660 663 999

WO 98/20035

5

10

15

20

25

30

35

Las especies de levadura comprendidas para su uso en la presente invención son especies metilotróficas, las cuales son capaces de crecer en medios conteniendo metanol u otros sustratos como otras fuentes de carbono.

Dentro de las especies que poseen las rutas bioquímicas necesarias para el empleo del metanol se encuentra 4 géneros: Candida, Hansenula, Pichia y Torulopsis.

En la presente invención, la especie de levadura preferida para el uso en la práctica es Pichia pastoris, una cepa de levadura conocida a nivel industrial y que es capaz de utilizar el metanol de forma eficiente como única fuente de carbono y energía.

Existen varios genes inducibles por metanol en las levaduras metilotróficas, cuya expresión es controlada por una región reguladora (también referidas como promotores) inducible en metanol. Cualquiera de estos promotores inducibles con metanol son apropiados para el uso en la práctica de la presente invención. Ejemplo de estas regiones regulatorias específicas, incluyen los siguientes promotores de *P. pastoris*: promotor del gen del alcohol oxidasa I (AOX1), promotor del gen de la dihidroxiacetona sintetasa (DAS), promotor para el gen P40, promotor del gen de la catalasa y semejantes.

La región promotora de preferencia a emplear para conducir la expresión del ADNc codificante para HGH es derivada del gen de la alcohol oxidasa inducible con metanol de *P. pastoris*. Esta levadura es conocida por tener dos genes funcionales de la alcohol oxidasa: alcohol oxidasa I (*AOX1*) y la alcohol oxidasa II (*AOX2*). Las regiones codificantes de los dos genes *AOX* son estrechamente homólogas, los sitios de restricción comunes son similares y la secuencia de aminoácidos es parecida. Las proteínas expresadas por los dos genes poseen propiedades enzimáticas similares, pero el promotor del gen *AOX1* es mas eficiente en cuanto a su función reguladora y con niveles mas altos del producto de gen que regula el promotor del gen *AOX2*; por eso su uso es preferido para expresión de HGH. El gen *AOX1*, incluyendo su promotor ha sido aislado y caracterizado por Ekkus *et al* (1985), y reportado en la Patente Norteamericana U.S. 4,855,231.

El cassette de expresión usado para transformar las células de una levadura metilotrófica, contiene, además del promotor inducible con metanol del gen de una levadura metilotrófica y la secuencia del ADNc que codifica para HGH, la secuencia de ADN que codifica

WO 98/20035

5

10

15

20

25

30

35



para la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae*, incluyendo la secuencia de ADN que procesa el sitio: lys-arg (también referida como secuencia codificante lys-arg) y un terminador de la transcripción funcional en una levadura metilotrófica.

El factor alfa-mating de S. cerevisiae es un polipéptido de 13 residuos, secretado por células del tipo alfa del apareamiento (Thorner *et al*, 1981). La secuencia pre-pro del factor alfa es una secuencia líder contenida en la molécula precursora del factor alfa de apareamiento, incluye la secuencia codificante lys-arg, la cual es necesaria para el procesamiento proteolítico y secreción (Goeddel, 1991).

El terminador de la transcripción funcional en una levadura metilotrófica usada, de acuerdo con la presente invención, contiene tanto (a) un subsegmento, el cual codifica para la señal de poliadenilación y el sitio de poliadenilación en el trascrito y/o (b) un subsegmento, el cual provee una señal de terminación de la transcripción para la transcripción del promotor usado en el cassette de expresión. El témino "cassette de expresión" usado aquí, y a través de las especificaciones y reivindicaciones, se refiere a la secuencia de ADN que incluye las secuencias funcionales tanto para el proceso de expresión y de secreción. El terminador de la transcripción completo es tomado de un gen que codifica una proteína, el cual puede ser el mismo o diferente al gen fuente del promotor.

Para la práctica de la presente invención es preferible que copias múltiples del antes descrito cassette estén contenidas en un fragmento de ADN de preferencia en una orientación cabeza-cola. Estos pueden construirse con procedimientos yar conocidos actualmente en estado de la técnica (Cregg et al, 1993).

El fragmento de ADN de acuerdo a esta invención también comprende un gen marcador de selección. Para estos propósitos, cualquier gen marcador de selección funcional en una levadura metilotrófica puede ser empleado; cualquier gen que confiera un fenotipo distinto a una célula de levadura metilotrófica, y por lo tanto permitiendo a éstas ser identificadas y cultivadas de forma selectiva de la mayoría de las células no transformadas. Genes marcadores de selección apropiados incluyen, por ejemplo, sistemas marcadores de selección compuestos de un mutante auxotrófico de cepas de *P. pastoris* y un gen biosintético de tipo silvestre, el cual complementa el defecto en las células hospederas. Por ejemplo, para la transformación de cepas de *P. pastoris* His4-, pueden ser empleados el gen HIS4 de *S. cerevisiae* ó de *P. pstoris*, o para la transformación de mutantes de Arg4-, pueden ser empleados el gen ARG4 de *S. cerevisiae* y de *P. pastoris*.

Además, el fragmento de ADN de acuerdo con esta invención, puede contener genes marcadores de selección funcionales en bacterias. Así, puede ser empleado cualquier gen que confiera un fenotipo en bacterias que le permita transformarlas para su identificación y cultivo

10

15

20

25

30



selectivo o identificarlas de la gran mayoría de las células no transformadas. Este marcador de selección adicional permite que el ADN de la invención sea introducido en bacterias tales como *E. coli* para su amplificación. Genes marcadores de selección apropiados incluyen: el gen de resistencia a ampicilina (Amp´), el gen de resistencia a tetraciclina (Tc´), y los semejantes.

Cuando es contemplado introducir el ADN de esta invención a través de células bacterianas, es deseable incluir en la construcción del ADN un origen de replicación bacteriano, para asegurar el mantenimiento de generación a generación en la bacteria del ADN de la invención. Ejemplos de origenes de replicación bacteriano incluyen: F1, colisina, col E1, y semejantes.

Si la levadura hospedera es transformada con un fragmento de ADN lineal conteniendo el ADNc que codifica para HGH y la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* necesaria para su procesamiento y secreción y ambas bajo la regulación de un promotor de un gen de P. pastoris y el cassette de expresión es integrado en el genoma del hospedero por alguna de las técnicas de recombinación genética conocidas en el estado de la técnica, tales como reemplazamiento del gen por recombinación homóloga a través de un evento de entrecruzamiento simple o por inserción (Rothstein, 1983; y Cregg, 1987). El fragmento de ADN lineal es dirigido hacia el *locus* deseado, el gen objetivo es interrumpido en su marco de lectura, debido principalmente a que los extremos de la secuencia del ADN poseen suficiente homología con el gen objetivo para efectuar la integración del fragmento del ADN en éste. En la interrupción del marco de lectura del gen en una etapa es usualmente aplicable, si el ADN que es introducido tiene por lo menos 0.2kb de homología con el fragmento *locus* del gen objetivo; sin embargo, es preferible optimizar el grado de homología para lograr la eficiencia.

Si el fragmento de ADN de acuerdo a esta invención es contenido en un vector de expresión, por ejemplo un plásmido circular; una o más copias del plásmido pueden ser integradas en el mismo o diferentes *loci* por adición en el sitio interrumpido en el genoma. Linearización del plásmido con enzimas de restricción facilitan este tipo de integración.

El fragmento de ADN relacionado con la invención puede ser empleado para transformar células de levaduras metilotróficas como un fragmento linearizado cuyos extremos contienen secuencias de ADN que presentan homología suficiente con el gen objetivo para poder llevar a cabo la integración de dicho fragmento de ADN en el genoma de la levadura. En ese caso, la integración toma lugar por reemplazamiento en el sitio objetivo del gen. De forma alternativa, el fragmento de ADN puede formar parte de un plásmido circular el cual puede ser linearizado para facilitar la integración, y se integrará por adición al sitio homología en el genoma del hospedero y la secuencia del plásmido circular el cual puede ser linearizado para

10

15

20

25

30



facilitar la integración, y se integrará por adición al sitio de homología entre el genoma del hospedero y la secuencia del plásmido.

En el término vector de expresión empleado aquí, se entiende que se incluyen vectores capaces de expresar secuencias de ADN contenidas en ellos, de donde tales secuencias están asociadas funcionalmente con otras secuencias capaces de afectar su expresión, como por ejemplo, secuencias promotoras. En general, vectores de expresión habitualmente usados en las tecnologías de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de "plásmidos", ADN de doble cadena circular, el cual en su forma de vector no está unido al cromosoma. En la presente descripción al término "vector" y "plásmido" son usados de forma indistinta, sin embargo, en la presente invención se entiende que se pueden incluir otras formas de vectores de expresión las cuales sean funcionalmente equivalentes.

En el fragmento de ADN de la presente invención, los segmentos del cassette de expresión asociados funcionalmente, indican que la secuencia de ADN codificante para el polipéptido de HGH está colocada y orientada funcionalmente con respecto al promotor, a la secuencia de ADN codificante para la secuencia pre-pro del factor alfa de S. cerevisae (incluyendo las secuencias de ADN codificante para el sitio de procesamiento: lys-arg), y al terminador de la transcripción. Así, el segmento codificante del polipéptido es transcrito bajo la regulación de la región promotora, a un trascrito capaz de proveer, después de llevar a cabo la traducción, el polipéptido deseado. Debido a la presencia de la secuencia pre-pro del factor alfa, el producto expresado del ADNc de HGH es encontrado como producto secretado hacia el medio de cultivo. Un marco de lectura apropiado y la orientación de los segmentos del cassette de expresión están dentro del conocimiento de personas ordinariamente relacionadas con el estado de la técnica; detalles adicionales de construcción de dicho cassette están dados en los ejemplos.

El fragmento de ADN proporcionado por la presente invención pueden incluir secuencias que permiten su replicación y selección en bacterias; de esta forma, grandes cantidades del fragmento de ADN puede ser producidos por su replicación en la bacteria.

Métodos para la transformación de levaduras metilotróficas, tales como, *Pichia pastoris*, así como los métodos aplicables para el cultivo de células de levaduras metilotróficas conteniendo en su genoma un gen codificante para una proteína heteróloga, son conocidos actualmente en el estado de la técnica.

De acuerdo a la presente invención, el cassette de expresión puede emplearse para transformar células de levaduras metilotróficas, tanto por la técnica de esferoplastos (Cregg, et al, 1985), por electroporación (Simon y McEntee, 1990) y por el sistema de transformación de

10

15

20

25

30

35



٠,٢

cloruro de litio (lto et al, 1984). Sin embargo, para el propósito de la presente invención los métodos de electroporación y esferoplastos son preferidos.

Células transformadas positivas pueden ser caracterizadas por análisis de PCR ó "Southern blot" para corroborar la integración del fragmento de ADN. Para el análisis de la expresión del ADNc de HGH inducible con metanol se puede emplear la técnica de retrotranscripción acoplada a PCR ó la de "Northern blot"; y para el análisis del producto, con la presencia de HGH secretada hacia el medio de cultivo, verificable por técnicas electroforéticas o inmunológicas.

Cepas transformadas que contengan el fenotipo y genotipo deseado son cultivadas en fermentadores para la producción a gran escala del producto recombinante. Una fermentación en lote en tres etapas es normalmente preferida para el protocolo de fermentación, éste ya es conocido en el estado de la técnica (Clare, et al, 1991; y Brierley, et al, 1991).

El término "cultivo" significa una propagación de células en un medio que conduce a su crecimiento y todos los subcultivos consecuentes. El término "subcultivo" se refiere a cultivos de células crecidas de células de otros cultivos (cultivo madre) o cualquier subcultivo del cultivo madre, dependiendo del número de subcultivos que hayan sido desarrollados entre el subcultivo de interés y el cultivo madre.

De acuerdo con las preferencias referidas de la presente invención, el sistema de expresión de proteínas heterólogas usado para la expresión del ADNc de HGH emplea el promotor derivado del gen metanol regulable AOX1 de P. pastoris, el cual es expresado de forma muy eficiente y regulado de forma precisa. Este gen puede ser también la fuente de la secuencia de terminación de la transcripción. El cassette de expresión preferido en el presente invención comprende, funcionalmente asociado uno con otro, el promotor AOX1 de P. pastoris, la secuencia de ADN codificante para la secuencia pre-pro del factor alfa (incluyendo la secuencia de ADN codificante para el sito de procesamiento: lys-arg), la secuencia codificante para la HGH madura y un terminador de la transcripción derivado del gen AOX1 de P. pastoris, preferiblemente dos o más del cassette de expresión mencionado, constituidos por un fragmento de ADN, en orientación cabeza-cola, para rendir un cassette de expresión múltiple en un único fragmento de ADN. En la presente invención se da preferencia a las células hospederas transformadas con el cassette de expresión y de las cuales se prefiere a P. pastoris, teniendo por lo menos una mutación que puede ser complementada con un gen marcador de selección presente en el fragmento de ADN transformante. La cepa mutante auxotrófica de P. pastoris His4- (GS 115, ATCC20864) ó ARG4- (GS 190) son preferidas. El fragmento conteniendo el cassette de expresión es insertado dentro de un plásmido conteniendo un gen marcador, el cual complementa el hospedero defectuoso y de forma

10

15

20

25

30



opcional contiene secuencias adicionales tales como genes marcadores para bacterias y secuencias génicas de levaduras que dirigen la integración del vector.

Para el desarrollo de cepas de P. pastoris Mut- (Mut se refiere al fenotipo que emplea metanol) el ADN que comprende el cassette de expresión para transformar las levaduras es integrado preferiblemente dentro del genoma de la levadura por una técnica de recombinación por reemplazamiento. El vector de expresión es digerido con una enzima apropiada para rendir un fragmento de ADN lineal cuyos extremos son homólogos al AOX1 locus. Como un resultado de reemplazamiento del gen, son obtenidas cepas Mut-. En cepas Mut-, el gen AOXQ es reemplazado por el cassette de expresión y por lo tanto en esta cepa decrece su habilidad de emplear al metanol. Una velocidad de crecimiento lenta es mantenida con metanol debido a la expresión del producto del gen AOX2. Las células transformadas que tienen integrado el cassette de expresión dentro del locus AOX1 (por recombinación sitio dirigida) pueden ser identificadas en un primer tamizaje por la presencia del gen complementador. Este es de preferencia detectado por el crecimiento de las células en medios careciendo del producto del gen complementador e identificando aquellas células capaces de crecer gracias a la expresión de este gen. Además, las células seleccionadas son tamizadas por su genotipo Mut creciéndolas en presencia de metanol registrando la velocidad de su crecimiento o bien empleando técnicas de PCR.

En el desarrollo de cepas Mut+ que expresan el ADNc de HGH, el fragmento que contiene uno o mas cassette de expresión es integrado de preferencia dentro del genoma del hospedero por transformación del hospedero con un plásmido circular o un plásmido lineal que contiene el cassette. La integración es por adición a un *locus* (o *loci*) teniendo homología con una o mas secuencias presentes en el vector de transformación.

Levaduras metilotróficas transformadas, las cuales son identificadas al tener el genotipo y fenotipo deseados, son cultivadas en fermentadores. Es preferido el uso de procesos de producción en tres etapas como se describió anteriormente. Los niveles de HGH secretada en el medio pueden ser determinados por análisis de Western blot, radioinmunoensayo ó ELISA en el medio, y en paralelo con estándares de HGH, usando antisueros antiHGH. También, por análisis electroforético ó por HPLC, después de un tratamiento previo adecuado del medio. La invención será ahora descrita con mas detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

De acuerdo con la presente invención se ha construido un fragmento de ADN conteniendo al menos una copia de un cassette de expresión el cual contiene en la dirección del marco de lectura de la transcripción las siguientes secuencias de ADN:

10

15

20

25

30

35





- i) una región promotora de un gen inducible con metanol de una levadura metilotrófica;
 - ii) una secuencia de ADN que codifica para:
 - a) la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* incluyendo el sitio del procesamiento proteolítico: lys-arg;
 - b) el polipéptido de 191 aminoácidos correspondiente a la hormona de crecimiento humano madura; y
 - c) una porción de ADN sintético adaptador que permite reconstituir secuencias (a) y (b), asegurando su óptima integración y funcionalidad.
 - una secuencia de terminación de la transcripción funcional en una levadura metilotrófica, de donde las llamadas secuencias de ADN están asociadas de forma funcional unas con otras para llevar a cabo la transcripción de las secuencias que codifican al polipéptido mencionado.

De acuerdo con otro apartado de la presente invención, se construyó un vector de expresión conteniendo al menos una copia del cassette de expresión como se describió anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la siguiente invención, se ha provisto de nuevas cepas de levaduras metilotróficas, particularmente la cepa ATTCC con certificado de depósito de microorganismos No. ATCC 74398 conteniendo en su genoma al menos una copia del fragmento de DNA arriba descrito.

Cultivos viables de células de levaduras metilotróficas capaces de producir HGH recombinante están también dentro del ámbito de la presente invención.

Se entenderá que polipéptidos de HGH deficientes en uno o más aminoácidos de la secuencia aminoacídica reportada en la literatura presente en la forma natural de HGH, ó polipéptidos conteniendo aminoácidos adicionales o polipéptidos en los cuales uno o mas aminoácidos de la secuencia aminoacídica de la forma natural de HGH son reemplazados por otros aminoácidos, se encuentran contemplados en el alcance de la presente invención, como por ejemplo todas las variaciones alélicas y no alélicas pero genéticamente relacionadas a HGH, tales como las HGHs de origen placentario, las isoformas de HGH (20kDa) y las GHs de otras especies animales con alto grado de homología en su secuencia nucleotídica y funciones biológicas semejantes; además como es especificado arriba, derivados obtenidos por modificaciones simples de la secuencia aminoacídica de la HGH natural a través de mutagénesis sitio dirigida u otros procedimientos estándares. Formas de HGH producidas por proteólisis en las células hospederas que exhiben actividad biológica similar que HGH madura también son incluídas por la presente invención.

10

15

20

25

30

35





EJEMPLOS

EJEMPLO 1. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pPIC9hGH22K

La construcción del vector de expresión descrito en la presente invención, es llevada a cabo de la siguiente manera:

Se aísla el fragmento Xba I-Sma I de 563 pb a partir del vector pJT mostrado en la figura 1, que contiene una versión modificada por mutagénesis dirigida de la secuencia del ADNc codificante para la hormona del crecimiento humano hGHADNc. El fragmento de 563 pb es portador de los codones 8 al 191 de la HGH madura, además de contener 12 nucleótidos de la región no traducible en su extremo 3' hasta el sitio natural Sma I.

El vector de expresión pPIC9 de Pichia pastoris, mostrado en la figura 2, descrito en las patentes americanas publicadas No. 4,882,279; 4,855,231 y 4,808,537 y que contiene la región promotora del gen AOX1 ubicado en el nucleótido 763, seguido por la secuencia codificante de la secuencia pre-pro del factor alfa de S. cerevisiae desde el nucleótido 949 al 1218 (esta secuencia contiene el sitio de procesamiento proteolítico lys-arg en el nucleótido 1201 al 1203 y el sitio del reconocimiento glu-ala (1204-1206), éste a su vez seguido del sitio de clonación múltiple (1192-241), una secuencia de terminación de la transcripción AOX1 (1253-1586), un codon de terminación del extremo 3' de la secuencia de terminación de la transcripción del gen AOX1 (1246), es cortado con las enzimas Xho I y Sna Bl. El vector pPIC9 tratado con Xbo I y Sna BI (1193-1218) pierde 11 nucleótidos (1193-1203) del extremo 3' de la codificante para la secuencias pre-pro del factor alfa de S. cerevisiae, justo hasta el sitio de procesamiento proteolítico: lys-arg. Para la reparación de los 11 nucleótidos removidos de la secuencia señal del factor alfa y completar los 7 codones faltantes desde el primer codon, fenilalanina, de la hormona del crecimiento humana madura, se empleó un fragmento de ADN sintético (figura 3) conteniendo los sitios Xho I y Xba I para facilitar la unión de los fragmentos antes mencionados.

El plásmido pPIC9 digerido con *Xho* I y *Sma* BI, el fragmento de 563 pb obtenido de pJT, y un adaptador sintético, se pusieron en una misma reacción de ligación, posteriormente con una alícuota de la reacción de ligación se transformaron células de *E. coli* para su propagación y posterior análisis de las clonas para detectar a las portadoras del plásmido pPIC9hGH22k.

a) Preparación de los plásmidos pPIC9 y pJT.

Células calcio-competentes de *E.coli* TOP 10F' (Invitrogen, Co. San Diego Ca, EUA) fueron transformadas con los plásmidos pPIC9 y PJT. La preparación de bacterias calcio-competentes así como la transformación se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook y cols (1989). Posteriormente se levantaron colonias de bacterias portando el



10

15

25

30



plásmido pPIC9 o pJT y se cultivaron en 1L de caldo LB (Triptona 1%, Cloruro de Sodio 0.5% y Dextosa 1%) para después realizar aislamiento de ADN plasmídico a gran escala utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio (Cab-Barrera y Barrera-Saldaña, 1988). De esta manera se obtuvo una fuente de plásmidos de buena calidad para llevar a cabo la construcción del plásmido pPIC9hGH22k.

b) Preparación de fragmentos para ligación y reacción de ligación.

La digestión de pJT con la enzima Xba I se llevó a cabo con la siguiente mezcla de 50L de reacción: 2μL Xba I (10U/μL), 5 μL solución amortiguadora 10X, 5μL albumina serica bovina (ASB) 10X, 13μL ADN (pJT 600 ng/μL), 25μL Agua Milli-Q2.

La reacción se efectuó a 37°C durante 5 h y después se agregaron 2 μL de la endonucleasa Sma l (10U/μL) y se incubó durante toda la noche a 25°C.

La digestión pPIC9 con las endonucleasas *Xho* I y *Sna B*I se realizó de la siguiente manera: primero se llevó a cabo el corte con la enzima *Sna B*I incubando a 37°C por 5 h con la siguiente mezcla de reacción: 5μ L de Sna BI (4 U/ μ L), 5μ L buffer 10X, 5μ L ASB 10 X, 15μ L ADN (pPIC9 800 ng/ μ L) y 20mL agua Milli-Q. Posteriormente se agregaron 2 μ L de la endonucleasa Xho I (10 U/ μ L) y se incubó durante toda la noche a 37°C.

El éxito de las digestiones se verificó por análisis de alículotas de 1µL mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez concluidas las digestiones preparativas antes mencionadas, se llevó a cabo la electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1% con 25μL de cada reacción de digestión y se realizó una tinción con bromuro de etidio (2µg/mL en TBE (amortiguador Tris-borato-EDTA). Los fragmentos de 563 pb de la digestión de pJT con Xba I y Sma I y de 7966 pb de la digestión de pPIC9 con Xbo I y Sna BI, fueron recuperados del gel cortando las bandas correspondientes con ayuda de un bisturí. Estos se extrajeron de la matriz de agarosa utilizando la técnica de "Geneclean" (The Geneclean II Kit Bio 101, Inc., Ca, EUA) y se almacenaron en amortiguador TE (Tris-EDTA) a -20°C hasta su empleo. El adaptador sintético empleado se construyó a partir de oligonucleótidos sintéticos complementarios que fueron proporcionados en cadena sencilla, para lo cual se empleó un sintetizador Oligo-1000 (Beckman) para su síntesis. Previo a la reacción de ligación, éstos fueron apareados por complementariedad de bases de la siguiente manera: se llevó a cabo la mezcla conteniendo: 5μL de amortiguador TE 10 X, 3.3μL de NaCl 150 mM, 21μL del oligonucleótido 1 (0.74mM) y 21μL del oligonucleótido 2 (0.70μM), dando lugar a una solución de NaCl 10mM, Tris-HCl 10mM, y EDTA 1mM, se calentó la mezcla a 80°C por 5 minutos, se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente y se almacenó a -20°C hasta su uso.

10

15

20

25

30



La reacción de ligación se llevó a cabo en una proporción molar 1:8:40 (fragmento de 7996 pb: fragmento de 563 pb: adaptador 30 pb). La ligación se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, para visualizar la ausencia de los fragmentos de ligación (7996 y 563 pb) y la presencia de bandas de mayor peso molecular. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* TOP 1OF' con una alícuota de 5µL de producto de ligación usando bacterias calcio-componentes.

c) Análisis de clonas portadoras de pPIC9hGH22K

De las colonias obtenidas de la transformación (resistentes a ampicilina) se levantaron 20 para su inoculación individual en tubos con 4mL de caldo LB con ampicilina (100mg/L). Se incubaron a 37°C y a 250rpm durante 18 horas. Posteriormente se tomaron 2 mL de cada cultivo y se realizó aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (minipreparación) de acuerdo al método descrito por Smbrook y cols (1989). El ADN plasmídico aislado de cada una de las clonas fue tratado con la endonucleasa Xba I, para detectar el plásmido pPIC9HGH22K, el cual debería presentar fragmentos específicos de 7210 y 1377 pb, debido a que dicha enzima corta en las posiciones 1222 y 2599. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para analizar las digestiones. Las clonas que mostraron el patrón esperado fueron caracterizadas más exhaustivamente, realizando digestiones con cada una de las siguientes endonucleasas: Xho I, Xho I+Eco RI, Xba I, Pvu II y Bgl II. Los fragmentos teóricos según el análisis computacional alimentado con la secuencia del plásmido pPIC9HGH22K, se muestra a continuación: Xho I (8587 pb), Xho I + Eco RI (7990 y 597 pb), Xba I (7210 y 1377 pb), Pvu II (4875, 2948, 497 y 267 pb), Bgl II (4574, 2403 y 1616 pb).

Se seleccionó una de las clonas que presentó el patrón de restricción esperado y se realizó preparación ADN plasmídico a gran escala utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio (Cab-Barrera y Barrera-Saldaña, 1988). De esta manera se obtuvo una fuente de plásmido de buena calidad para llevar a cabo la transformación de *Pichia pastoris*.

De la transformación de *E. coli* con 5µL del producto de ligación se obtuvieron 300 colonias de las cuales fueron tomadas 20 para determinar las portadoras del plásmido recombinante (pPIC9HGH22K). Tres de ellas resultaron poseer el plásmido que generaba los fragmentos especificos esperados al ser digerido con la endonculeasa *Xba* I (7210 y 1377 pb). La caracterización exhaustiva del ADN plasmídico de una de las clonas seleccionadas, con las endonucleasas *Xho* I, *Xho* I + *Eco* RI, *Xba* I, *Pvu* II y *BgI* II, mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron a los tamaños esperados según su mapa de restricción.

EJEMPLO 2. TRANSFORMACION Pichia pastoris

10

15

20

25

30



Una vez asegurada la identidad del vector pPIC9HGH22K se realizaron digestiones para linearizar el plásmido con las endocnuleasas Sac I y Stu I y de esta manera llevar a cabo la transformación. El plásmido linearizado con Sac I favorece la inserción génica en el locus AOX1 y el plásmido linearizado con Stu I la inserción génica en locus His4 (Invitrogen, 1994), desarrollando de esta manera cepas Mut+ en ambos casos. Las células de Pichia pastoris GS 115 (ATCC20864) fueron transformadas por electroporación (Simon y McEntee, 1990) con los plásmidos linearizados como se describe a continuación: las células de Pichia pastoris se cultivaron en 50mL de caldo YPD a 30°C y 250rpm hasta llegar a la fase logarítmica tardía (DO600 2.0). Luego se centrifugó a 5000rpm por 5 min (centrifuga IEC Centra MP4R Rotor 854) para obtener el paquete celular, el cual se lavó dos veces, primero con 25 mL de agua Milli-Q estéril y después con 2 mL de sorbitol 1M estéril, y se resuspendió en 0.5 mL del mismo $(DO_{600} = 2.0)$. Se mezclaron 20µL de esta suspensión celular con 5µL del ADN lineal (50ng/µL), se transfirió a las micro-cámaras de electroporación de 0.15cm y se llevó a cabo la electroporación con un pulso de 400V, 10µF y un campo de fuerza de 2666.6V/cm. Se tomaron 10µL de la mezcla de elctroporación y se le añadieron 0.5µL de sorbitol 1M estéril. Posteriormente se distribuyó el contenido del tubo Eppendorf en placas con medio mínimo con dextrosa (MD, base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34%, biotina 4x10 -5%, dextrosa 1%) y se incubó a 30° C hasta la aparición de las colonias (3-6 días). Ya que el medio MD carece de histidina, solamente crecen las levaduras que hayan integrado el plásmido en su genoma y que por lo tanto son capaces de sintetizar histidina (His+). Posteriormente se levantaron colonias de ambas preparaciones y se llevaron a conservación para su posterior análisis.

La transformación de *Pichia pastoris* con los dos plásmidos linearizados dió como resultado 54 clonas transformadas con el plásmido cortado con *Sac*l y 33 clonas transformadas con el plásmido cortado con *Stu* I. Las clonas obtenidas presentan un fenotipo His+ (capacidad de sintetizar histidina) debido a haber crecido en un medio sin histidina, adquirido por la integración del plásmido.

Las clonas resultantes de la transformación con ambas preparaciones (digestiones con Sac I y Stu I) se cultivaron en tubos con 4mL de caldo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) durante 48h a 30 °C y agitación a 250rpm. Posteriormente se obtuvo la pastilla celular por centrifugación a 16000g (14000 rpm centrifuga Eppendorf 5402) durante 5 minutos, se resuspendió en YPD con 15% de glicerol en un volumen tal que tuviera una DO₆₀₀ de entre 50 y 100, se llevaron a congelación rápida en N₂ líquido y se almacenaron a -70°C (Izquierdo, 1993).

EJEMPLO 3. ANALISIS DEL ADN GENOMICO DE TRANSFORMANTE

a) Preparación del ADN genòmico

10

15

20

25

30

35



Para la extracción de ADN genómico de P. pastoris, se empleó una modificación a la técnica de TSNT (M. Izquierdo, 1993). Las levaduras crecieron en 4mLde caldo YPD durante 24-48h, se cosechó el paquete celular por centrifugación durante 5 minutos a 16000g y se lavó con 500µL de agua Milli-Q. Al paquete celular se le agregaron 300µL de solución de TSNT (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1% NaCI 100 mM, Tis-HCI 10 mM y EDTA 1mM, pH=8) y 650µL de fenol saturado y se mezcló en vortex durante 10s. Posteriormente se agregaron 150µL de Sevag (cloroformo: alcohol isomílico 1:1) y se agitó durante 5 minutos. Una vez concluida la agitación se añadieron a la mezcla 300µL de TE pH=8 y se procedió a centrifugar por 10 min a 16000g, se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga de 2mL y se precipitó el ADN agregando 1.3 mL de etanol al 100%. Se centrifugó por 10 min a 16000g y se decantó el sobrenadante, la pastilla de AND se resuspendió en 500µL de fenol-sevag, se separó la fase acuosa por centrifugación durante 5 min y 16000g. Se añadieron 10 µL de acetato de amonio 7.5M y 1.3mL de etanol al 100% para precipitación del ADN, se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 min a 16000 g para decantar el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con etanol al 70% y se resuspendió en 50µL de TE, solución a la cual se le realizó medición espectrofotométrica para cuantificación de ADN y determinación del parámetro de calidad (A₂₆₀/A₂₈₀). También se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE y tinción con bromuro de etidio para verificar si los ADN's genómicos no se encontraban degradados.

b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN genómico de seis clonas fue analizado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para corroborar la identidad del plásmido pPIC9hGH22K así como su integración en el genoma de P. pastoris. El iniciador del extremo GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') se aparea en la región 5'AOX1 (nucleótido 855-875) del plásmido pPlC9, el iniciador del extremo 3'(5'GCAATGGATTCTGACATCC-3') se aparea en la región 3' AOX1 TT (nucleótido 1327-1347) del mismo. Ya que la PCR de I plásmido pPIC9 resulta en un producto amplificado de 449 pb y el sitio de multiclonación (MCS) de pPIC9 se encuentra entre las dos regiones de apareamiento de los iniciadores, el fragmento clonado causa un aumento del tamaño del producto amplificado en 567 pb generando un fragmento de 1016 pb para pPIC9hGH22K. La PCR del ADN genómico de P. pastoris no recombinante dá por resultado un producto de 2200 pb proveniente de la amplificación del gen AOX1. La PCR de ADN genómico de clonas (P. pastoris recombinante) que conservan el gen AOX1 (Mut+), dá por resultado productos de 2200 y 1016 pb correspondientes al gen AOX1 y al cassette de integración respectivamente.

Se llevó a cabo la estandarización de la PCR con el objetivo de obtener bandas nítidas y lo mas lejano posible a la saturación para detectar multicopias del cassette de expresión en

10

15

20

25

30



caso de haberlas. Para la estandarización se empl aron diferentes concentraciones de ADN molde e iniciadores, también se varió el número de ciclos. La PCR estandarizada tuvo las siguientes condiciones: amortiguador de PCR (Promega) 1 X, ADN genómico 2ng/L, dNTP's 200µM, iniciador 5'AOX1 0.5µM, iniciador 3' AOX1 0.5µM, agua estéril y 2.5 unidades de Taq polimerasa en 25µL de reacción. Se empleó un termociclador PTC-150 (MJ Research), el programa llevado a cabo fue el siguiente: una etapa inicial de desnaturalización del ciclo a 94°C (2 min), una etapa de 18 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), alineación a 60°C (1 min) y extensión a 72°C (1 min) y una última etapa de extensión a 72°C (7 min). Se realizó el análisis de 5µL del producto de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE.

Debido a que las clonas Mut+ siempre cuentan con una sola copia del gen AOX1, la relación de la intensidad entre las bandas amplificadas (2200 pb y 1016 pb) resulta igual en diferentes clonas que contienen una sola copia del plásmido integrado. Considerando que la mayoría (99% aproximadamente) de las clonas de *P. pastoris* tendrían una copia del plásmido integrado, estas presentarían la misma relación de la intensidad de las bandas amplificadas. Por lo tanto las clonas con multicopias del plásmido integrado serían fácilmente detectables debido a que se distinguirían de entre la mayoría de clonas de una sola copia al cambiar la relación de intensidad entre ambas bandas (2200 pb/1016 pb), debido al aumento de la intensidad de la banda de 1016 o banda recombinante. Por lo tanto se realizó un análisis densitométrico de las bandas de PCR teñidas con bromuro de etidio para determinar la existencia de clonas con multicopias del plásmido integrado o si solo se contaba con clonas con una sola copia.

El tamaño de cada uno de los productos amplificados obtenidos por la PCR, correspondieron a los tamaños esperados para cada uno de los ADN's moldes empleados: pPIC9 (449 pb), pPIC9hGH22K (1016 pb), ADN genómico de P. pastoris no recombinante (2200 pb), clonas recombinantes Mut+ de P. pastoris (1016 y 2200 pb). En la figura 3 se muestran cada uno de los productos amplificados, separados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. En el carril M se muestra el marcador de peso molecular (tambda, Eco RI-Hind III), en el carril A se muestra el producto amplificado de pPIC9, en el carril B se encuentra el producto amplificado de pPIC9hGH22K, en el C se muestra el producto amplificado de ADN genómico de P. pastoris no recombinante, los carriles 1 al 6 representan productos amplificados de diferentes clonas recombinantes Mut+ de P. pastoris. También se muestra la relación de intensidad entre la banda de 2200 pb y 1016 pb para cada clona recombinante y tiene una media de 0.996±0.041 (X±E.S.,n=6), lo que demuestra que cada una de estas clonas tiene solo una copia del cassette de expresión integrado.



PCT/MX97/00033 WO 98/20035

EJEMPLO 4. PRODUCCION DE HGH MEDIANTE CLONAS RECOMBINANTTES DE P. pastoris

- 19 -

Fermentaciones a)

5

10

15

20

25

30

35

Se seleccionaron cuatro clonas preparadas mediante los ejemplos 1 a 3, dos por cada una de las transformaciones (ADNs digeridos con Sac I y Stu I). Cada una de las clonas fueron inoculadas del medio de conservación (viales con 15% de glicerol a -70°C) a placas con agar YPD (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) llevando a cabo una estría en tres campos con el fin de obtener colonias aisladas. Como ya se mencionó las fermentaciones con P. pastoris recombinante se dividen en dos fases, la fase de crecimiento celular y la fase de inducción o producción de proteína recombinante. A partir de colonias aisladas se inocularon 4 matraces Erlenmeyer de 250mL con 25 mL de medio amortiguado y con glicerol (IBMG, fosfato de potasio dibásico 100mM pH=6, base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34%, biotina 4x10 -5%, glicerol 1%) y se incubaron a 30°C en agitación (250rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 4.0. Con 3.125mL de este cultivo propagado se inocularon 22mL de medio BMG contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250mL para alcanzar una DO₆₀₀ inicial de 0.5, se incubó a las mismas condiciones hasta alcanzar una DO600 de 1.0. Posteriormente se eliminó el medio BMG por centrifugación (5000 rpm 5 min, centrífuga IEC Centra MP4R rotor 854) y se resuspendió en 25mL de medio amortiguado y con metanol (BMM, fosfato de potasio dibásico 100mM, pH=6, base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34%, biotina 4x10 -5%, metanol 0.5%). Se continuó la incubación a 30°C y 250rpm durante 150h y de esta manera se inició la etapa de inducción o producción de la proteína recombinante. Se añadió 125µL de metanol cada 24 h para compensar la pérdida por evaporación. Posteriormente se realizó SDS-PAGE e inmunodetección por la técnica de "Western blot" de HGH recombinante del mediio de cultivo libre de células, para determinar la identidad de la misma.

Análisis de proteínas (determinación de proteínas, SDS-PAGE y densitometría) b)

Debido a que en este sistema la HGHr es secretado al medio de cultivo, se realizó análisis de proteínas del medio de cultivo, el cual fue dializado contra agua Milli-Q antes del análisis. Las bolsas de diálisis con 25mL de medio permanecieron en un vaso de precipitados con 4L de agua fría durante 1.5 h, con agitación moderada y se realizaron dos cambios mas del agua Milli-Q. El medio dializado se concentró de la siguiente manera: se agregaron cuatro volúmenes de una solución metanol:acetona (1:1), se dejó a -20°C toda la noche, se centrifugó 10min. a 10,000rpm (centrífuga IEC Centra Mp4R, rotor 854), se eliminó el sobrenadante y se secó al vacío el paquete de proteínas. El paquete se resuspendió en 1/20 de su volumen original de buffer SDS-PAGE, se calentó durante 10 min. a 100°C, se centrifugó por 5 segundos para baja el líquido evaporado y condensado en las paredes del tubo y se aplicaron

de 10-20µL para la electroforesis en gel de poliacrilamida. La separación de proteínas se realizó por electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida 8gel separador al 12% y un gel concentrador de acrilamida al 4%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se aplicó un voltaje inicial de 80V hasta que el colorante penetró en el gel concentrador aproximadamente 1cm, y luego se incrementó éste a 140V, se mantuvo la electroforesis hasta que el colorante llegó al gel separador y finalmente se incrementó a 180V. El gel se fijó con una solución fijadora (metanol 50% v/v, ácido acétido 10% v/v, en agua desionizada) y se agitó a 40rpm durante 25 min., se retiró la solución colorante y se añadió solución decolorante (metanol 5% v/v, ácido acético 7% v/v, en agua desionizada) agitando a 40rpm durante 1h. El gel se continuó decolorando con cambios periódicos de la solución decolorante, hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel.

El porcentaje relativo de la proteína resultante de la fusión entre la HGH y la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) en los extractos celulares se determinó por densitometría en gel, basándose en la medición de la intensidad del color de las bandas obtenidas. El equipo empleado fue un densitómetro Zeineh Soft Laser (Scanning Densitometer, Modelo SLR-2D/ID, Biomed Instruments, Inc.) con Zeineh Programs Universal Software (Advanced American Biotechnology Biomed VGA Programs).

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Martínez, 1993), se empleó un espectrofotómetro para determinar la absorbancia a 595 nm que se presenta por la unión del azul brillante de Coomassie a las proteínas evaluadas. Se realizaron curvas-de calibración con estándares de albúmina de suero bovino (ASB, Sigma) en un intervalo de concentración de 1 a 6μg/mL. Tanto las muestras como los estándares fueron preparados por triplicado.

c) Inmunodetección por "Western blot"

5

10

15

20

25

30

35

Se realizó un análisis por SDS-PAGE bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Posteriormente se llevó a cabo la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa (0.45 micrones Bio-Rad) por 3h a 100V, ésta se incubó 1h con agitación a 40rpm en solución de bloqueo (Tween 20 al 0.3% v/v, albúmina de suero bovino al 0.3% p/v en PBS) para bloquear las áreas libres de proteína en la membrana.

Como primer anticuerpo se empleó un antisuero anti-HGH desarrollado en conejo (Sigma) en una dilución 1:1000 en 1% de solución de bloqueo en PBS. Este se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 15 min con agitación moderada con Tween 20 al 0.3% en PBS. Como segundo anticuerpo se empleó un anti-lgG de conejo desarrollado en cabra (Sigma) en una dilución 1:1000 en 1% de solución de bloqueo en PBS. Se incubó 1h a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de 15 min con agitación

WO 98/20035 PCT/MX97/00033

moderada con Tween 20 al 0.3% n PBS. Para el revelado se emplearon 10mL de la mezcla de sustratos cromogénicos que contenía 66µL de nitro-azul de tetrazolio (NBT) al 5% p/v y 33µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato (BCIP) al 5% p/v en amortiguador fosfato alcalino (NaCl 100mM, MgCl2 5mM, Tris-HCl 100 mM pH=9.5). Se añadió a la membrana y se agitó moderadamente hasta la aparición de las bandas de interés (10 min aproximadamente).

Las cuatro clonas recombinantes que fueron analizadas para la caracterización del producto de la expresión del gen heterólogo integrado, produjeron y secretaron HGH recombinante. El análisis electroforético en gel de poliacrilamida del medio de cultivo de una fermentación con una de las clonas de *P. pastoris* mostró que en el medio de cultivo de células inducidas aparece una banda de aproximadamente 22KDa que corresponde a la HGH recombinante, mientras que en el medio de cultivo de células no inducidas, no apareció ninguna banda. También se mostró la inmunodetección de HGH recombinante mediante la técnica de Western blot, empleando anticuerpos anti-HGH.

d) Secuenciación de proteína

5

10

15

20

25

30

Para ilevar a cabo el análisis del extremo amino terminal, el medio de cultivo dializado de una fermentación de la cepa de *P. pastoris* recombinante (clona 19) fue resuelto por SDS-PAGE y transferido a un filtro de nitrocelulosa. La banda correspondiente a una proteína de 22KDa, la cual fue inmunoreactiva en ensayos previos a anticuerpos anti-HGH, fue cortada y sujeta a secuenciación de los 15 residuos de aminoácidos del extremo aminoterminal. La secuenciación automatizada se realizó en un secuenciador automático de proteínas empleando la técnica de Edman, posteriormente se separaron los derivados de PTH para su identificación. La secuencia de los 15 residuos de aminoácidos del extremo amino-terminal de HGH recombinante secretada por la clona 19 fue idéntica a la secuencia de la HGH nativa. Implicando con esto, el reconocimiento correcto del sitio de procesamiento para la secuencia pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae*.

e) Actividad adipogénica

La actividad biológica de HGH recombinante fue evaluada determinando la capacidad de inducir la diferenciación de células 3T3-F442A/C4 en adipocitos, basándose en las técnicas reportadas previamente. La HGH recombinante secretada por la cepa recombinante de *P. pastoris* (clona 19) presentó actividad adipogénica, aunque 10 veces menor a la observada en la preparación patrón utilizada (HGH recombinante de Genentech). Estos resultados pueden ser debido a que la preparación probada fue un extracto crudo obtenido del medio de cultivo.

EJEMPLO 5. PRODUCCION DE HGH RECOMBINANTE

10

15

20

25

30

35



Fueron analizadas 24 colonias transformadas (18 cortes Sac I y 6 cortes Stu I) para seleccionar la transformante con mas altos niveles de producción de HGH recombinante, empleando condiciones de cultivo preliminares.

Una colonia fue inoculada en 3mL de medio BMG en tubos de 25 mL. Las células se crecieron a 30°C con agitación a 250rpm hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ entre 2 y 6. Posteriormente se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 10000rpm (centrifuga IEC Centra MP4R, rotor 854) por 5min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en medio BMM (medio inductor) en un volumen tal que resultara una DO₆₀₀ de 1.0. Se transfirieron 3 mL del medio ajustado a tubos estériles y se incubó a 30°C por 150h para inducir la expresión del gen heterólogo (hGH). Para mantener la inducción se agregó metanol al 100% cada 24h a una concentración final de 0.5%. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10,000 rpm (centrifuga IEC Centra MP4R, rotor 854), para separar la pasta celular del medio de cultivo y realizar análisis de proteínas en el medio de cultivo. Se realizó determinación de proteínas totales de las 24 clonas transformadas y porcentaje de HGH recombinante por densitometría de geles de 7 de las clonas transformadas con los niveles mas altos de proteínas totales. Con los valores obtenidos de estos parámetros se calculó la concentración alcanzada expresada como mg de HGHr/L de medio de cultivo.

La concentración de proteínas totales del medio de cultivo de las 24 clonas analizadas tiene una variación de entre 3 a 11mg/L. Los porcentajes de HGH recombinante obtenidos por densitometría de geles de poliacrilamida de las 7 clonas con mayores niveles de proteínas varian del 35 al 80%. La producción de HGH recombinante (mg/L) en estas 7 clonas tuvo valores de 3 a 9mg de HGH recombinante/L de medio de cultivo. La clona que alcanzó los niveles mas altos de producción de HGH recombinante (9 mg/L), fue la que se empleó para llevar a cabo la producción a nivel matraz.

EJEMPLO 6. ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCION DE HGH RECOMBINANTE CON *Pichia pastoris*

Esta etapa consistió en producir HGH recombinante con una clona seleccionada de P. pastoris recombinante.

La cepa de *P. pastoris* que produjo mas altos niveles de HGHr (80% y 9 mg/L) en tubos de ensayo, fue empleada para la producción de HGHr. En esta etapa de la producción extracelular de HGHr se realizaron un total de 7 pruebas modificando las variable de producción:

- concentración de metanol (inductor) en medio de cultivo (%)
- densidad óptica al inicio de la inducción (DO600)
- tiempo de inducción (TI).

10

15

20

25



El indicador de producción fue la concentración de HGH recombinante en el medio de cultivo, la cual se obtuvo a partir de los parámetros evaluados (% de HGH recombinante y la concentración de proteínas totales mg/L). De esta manera el resultado obtenido se expresó en mg de HGH recombinante/L de medio de cultivo. Los factores empleados para la producción, así como los valores de porcentaje de HGHr, proteínas totales y los niveles de producción de HGHr.

En la tabla que se muestra a continuación se observa que la variación de los factores respecto a los ensayos realizados muestran que la concentración de metanol se incrementó durante la producción, mientras la DO600 y el TI mostraron valores oscilantes. La DO₆₀₀ fluctuó entre 0.91 y 1.43, la concentración de metanol entre 0.25 y 1.36% v/v, el TI entre 140 y 186h.

ENSAYO	%M	DO ₆₀₀	TI(h)	PT (mg/L)	% DE HGHr	HGH (mg/L)
			ETAPA I			
Α	0.25	1.43	140	4.9	27.3	1.3
В	0.251	1.10	175	10.8	64.1	6.9
С	0.75	1.08	140	16.5	76.2	12.6
D	0.75	1.38	175	15.9	82.2	13.1
			ETAPA II			
CI	0.75	0.94	140	16.2	78.9	12.8
Ε	0.92	0.91	186	14.0	76.6	10.8
			ETAPA III			•
E1	0.92	0.97	186	12.1	68.9	8.4
F	1.36	1.07	160	18.6	48.6	9.1
			ETAPA IV			
C2	0.75	1.26	140	13.8	55.7	7.7
G.	1.06	1.37	166	7.7	31.1	2.4

M= metanol; DO= densidad óptica; TI= tiempo de inducción; PT= proteínas totales

Asimismo, el porcentaje relativo de HGHr fluctuó entre 31 y 82% mostrando valores oscilantes, mientras que la concentración de proteínas totales fluctuó entre 4.9 y 18.6mg/L y mostró un incremento durante la producción, aunque en el último ensayo se observa una disminución. La producción de HGHr fluctuó entre 1.3 y 13, mostrando un incremento y luego disminución. El ensayo (D) resultó ser el mejor tal como se muestra en la tabla. Este presentó una concentración de proteínas totales de 15±0.6mg/L (X±E.S., n=3) con un porcentaje de 80.7%, lo que se traduce en una producción de HGHr de 12.3±0.7 (X±E.S., n=3) y fue 900% mas productivo que el ensayo de menor producción (A). Por lo tanto las condiciones determinadas para alcanzar niveles óptimos de producción de HGHr fueron: DO600:1.38, concentración de metanol: 0.75% y TI: 175h.

Habiendo descrito la presente invención, ésta se considera una novedad y por lo tanto se reclama como propiedad lo convenido en las siguientes reivindicaciones.

10

15

20

25

30

35

- 24 -

REIVINDICACIONES

- Un fragmento de ADN conteniendo una o más copias de un cassette de 1. expresión que incluye:
- (i) una región promotora de un gen inducible con metanol de una levadura metilotrófica;
 - (ii) una secuencia de ADN que codifica para:
 - (a) La secuencia pre-pro del factor alfa de S. cerevisiae incluyendo el sitio del procesamiento proteolítico en lys-arg; y
 - (b) El polipéptido de 191 aminoácidos correspondiente a la hormona de crecimiento humano (HGH) madura; y
 - (c) Una porción de ADN sintético adaptador que permite reconstituir las secuencias (a) y (b), asegurando su óptima integración y funcionalidad.
 - (iii) una secuencia de terminación de la transcripción funcional en Pichia pastoris; donde:

la secuencia de ADN que codifica para la secuencia pre-pro del factor alfa y la secuencia del ADNc de HGH se encuentran funcionalmente asociadas de tal manera que bajo un proceso de transcripción y traducción, HGH madura biológicamente activa es secretada hacia el medio de cultivo;

el promotor y la secunecia de terminación se encuentran funcionalmente asociados con la secuencia de ADN codificante para el polipéptido antes mencionado;

la región promotora dirige la transcripción de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido por inducción con metanol en Pichia pastoris; y

la levadura metilotrófica es una especie, la cual pertenece a los géneros: Candida, Hansenula, Pichia y Torulopsis; que emplean al metanol como única fuente de carbono.

- El fragmento de ADN de la reivindicación 1, que además comprende por lo menos un gen marcador de selección y un origen de replicación para bacterias.
- El fragmento de ADN de la reivindicación 1, de donde la secuencia nucleotídica 3. que codifica para el polipéptido HGH madura que tiene la secuencia:

phe pro thr ile pro leu ser arg leu phe asp asn ala met

60

10 -5 leu arg ala his arg leu his gln leu ala phe asp thr tyr gln glu phe glu glu ala 30 15 20 25 tyr ile pro lys glu gln lys tyr ser phe leu gln asn pro gln thr ser leu cys phe 50 35 45 40 ser glu ser ile pro thr pro ser asn arg glu glu thr gln gln lys ser asn leu glu 65 70 55

PCT/MX97/00033 WO 98/20035

- 25 -

5

10

15

20

25

30

35

leu leu arg ile ser leu leu leu ile gin ser cys ala gly ala val gin phe leu arg 75 80 85 ser val phe ala asn ser leu val tyr gly ala ser asp ser asn val tyr asp leu leu 100 105 110 95 lys asp leu glu glu gly ile gln thr leu met gly arg leu glu asp gly ser pro arg 125 115 120 130 thr gly gln ile phe lys gln thr tyr ser lys phe asp thr asn ser his asn asp asp 135 140 145 150 ala leu leu lys asn tyr gly leu leu tyr cys phe arg lys asp met asp lys vl glu 165 170 155 160 thr phe leu arg ile val gln cys arg ser val glu gly ser cys gly phe 190 175 180 185

- Un plásmido que comprende el fragmento del ADN de la reivindicación 3. 4.
- Las células de levadura de Pichia pastoris transformadas por recombinación 5. homóloga con el fragmento de ADN de reivindicación 1 y 4.
 - 6. El fragmento de ADN de la reivindicación 1, de donde la llamada levadura metilotrófica es una cepa de Pichia pastoris.
 - 7. El fragmento de ADN de la reivindicación 6, de donde el llamado gen inducible con metanol de una levadura metilotrófica y la secuencia de terminación de la transcripción son derivadas del gen AOX1 de P. pastoris.
 - El fragmento de ADN de la reivindicación 7, el cual contiene extremos 5' y 3' con 8. homología suficiente con el gen objetivo de una levadura hospedera, para poder dirigir la integración del mencionado fragmento de ADN en el gen objetivo, de donde la levadura hospedera es una especie de Pichia que usa al metanol como única fuente de carbono.
 - El fragmento de ADN de la reivindicación 8, conteniendo múltiples copias del 9. llamado cassette de expresión.
 - Las células de Pichia pastoris transformadas con el fragmento de ADN de la 10. reivindicación 9.
- Un cultivo viable de células de P. pastoris conteniendo las células de la 11. reivindicación 10.
 - 12. Células de Pichia pastoris transformadas con el fragmento de ADN de la reivindicación 8 del depósito de microorganismos No. ATCC 74398.
 - Un cultivo de células viables de P. pastoris conteniendo las células de la 13. reivindicación 12 y correspondientes al depósito de microorganismos No. ATCC 74398.
 - El fragmento de ADN de la reivindicación 1, conteniendo múltiples copias del 14. llamado cassette de expresión.

10

15

20

25

30

WO 98/20035 PCT/MX97/00033

- 15. El fragmento de ADN de la reivindicación 14, de donde las múltiples copias de cassette de expresión están orientadas en una orientación cabeza-cola.
- 16. Células de levadura de *Pichia pastoris* transformadas con el fragmento de ADN de la reivindicación 14.
- 17. Un proceso para la producción de la hormona del crecimiento humano que comprende el cultivo de células de *Pichia pastoris* de la reivindicación 16 bajo condiciones en las cuales el polipéptido de HGH es expresado y secretado hacia el medio de cultivo.
- 18. El proceso de la reivindicación 17, de donde las llamadas células son cultivadas en un medio conteniendo metanol como única fuente de carbono.
- 19. El proceso de la reivindicación 17, de donde las mencionadas células tiene el fenotipo Mut+.
- 20. El proceso de la reivindicación 17, de donde las mencionadas células tienen el fenotipo Mut+-.
- 21. Células de *Pichia pastoris* transformadas con el fragmento del ADN de la reivindicación 1 del depósito de microorganismos No. ATCC 74398.
- 22. Un cultivo viable de células de *Pichia pastoris*, conteniendo las células de la reivindicación 21 del depósito de microorganismos No. ATCC 74398.
- 23. Un proceso para la producción de polipéptidos de hormona del crecimiento humano, incluyendo los cultivos de las células de *Pichia pastoris* de la reivindicación 21 bajo condiciones en las cuales, el polipéptido de HGH es expresado y secretado hacia el medio de cultivo.
- 24. El proceso de la reivindicación 23, de donde las mencionadas células son cultivadas en un medio conteniendo metanol como única fuente de carbono.
- 25. El proceso de la reivindicación 23, de donde las mencionadas células poseen un fenotipo Mut+.
- 26. El proceso de la reivindicación 23, de donde las mencionadas células poseen un fenotipo Mut-.
- 27. El fragmento de ADN de la reivindicación 1, de donde la región promotora es seleccionada de un grupo de regiones promotoras inducibles con metanol de *Pichia pastoris* consistiendo del promotor del gen del alcohol oxidasa I (AOX1), la región promotora del gen del alcohol oxidasa II (AOX2), la región promotora del gen de la dihidroxiacetona sintetasa (DAS), el promotor del gen P40 y el promotor del gen de la catalasa que dirigen la transcripción de secuencia de nucleótidos que codifican para el polipéptido, los cuales son inducibles con metanol en *Pichia pastoris*.

WO 98/20035 PCT/MX97/00033

1/3

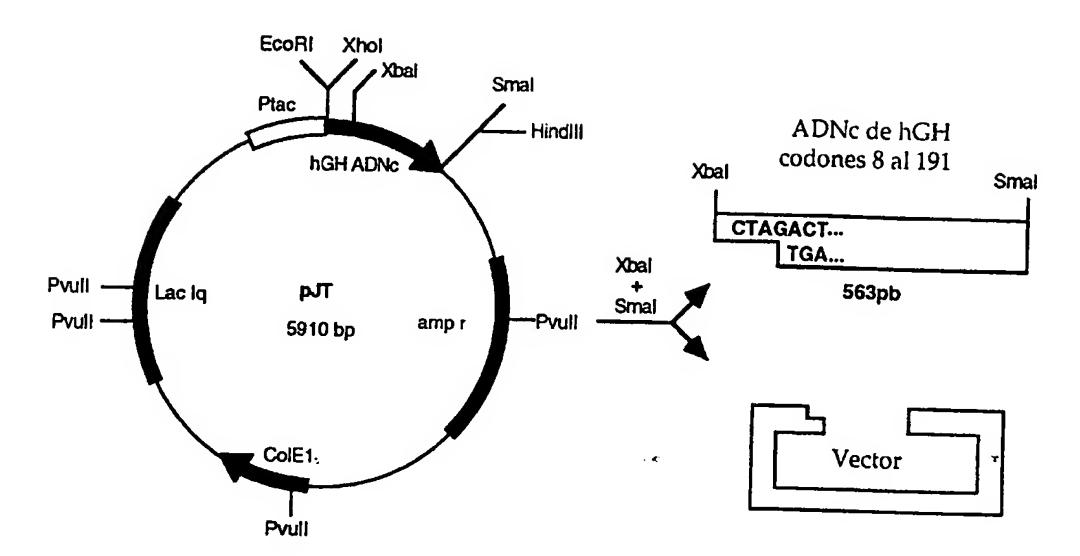


Figura 1

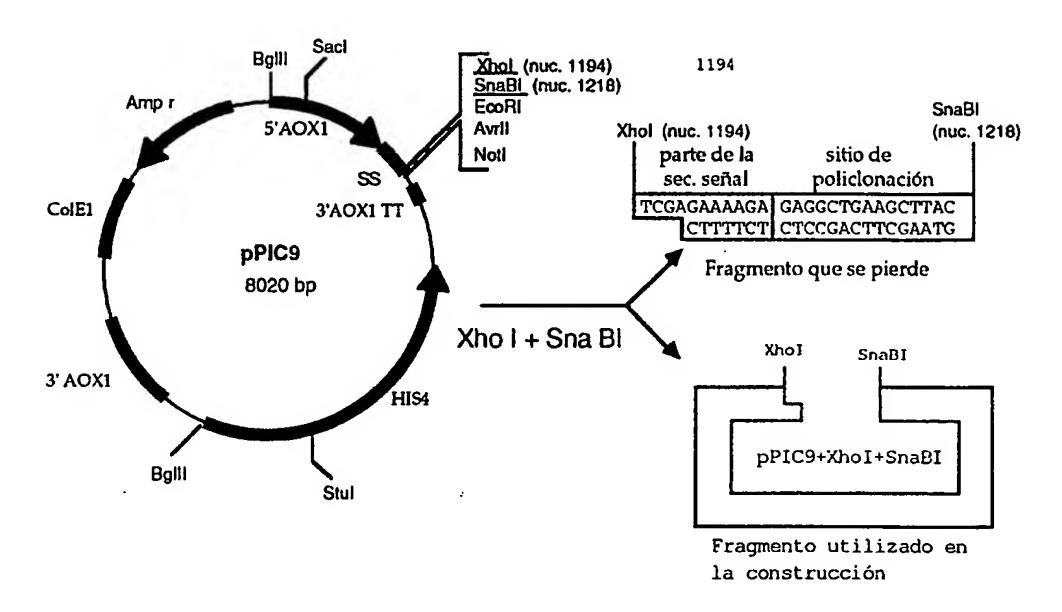
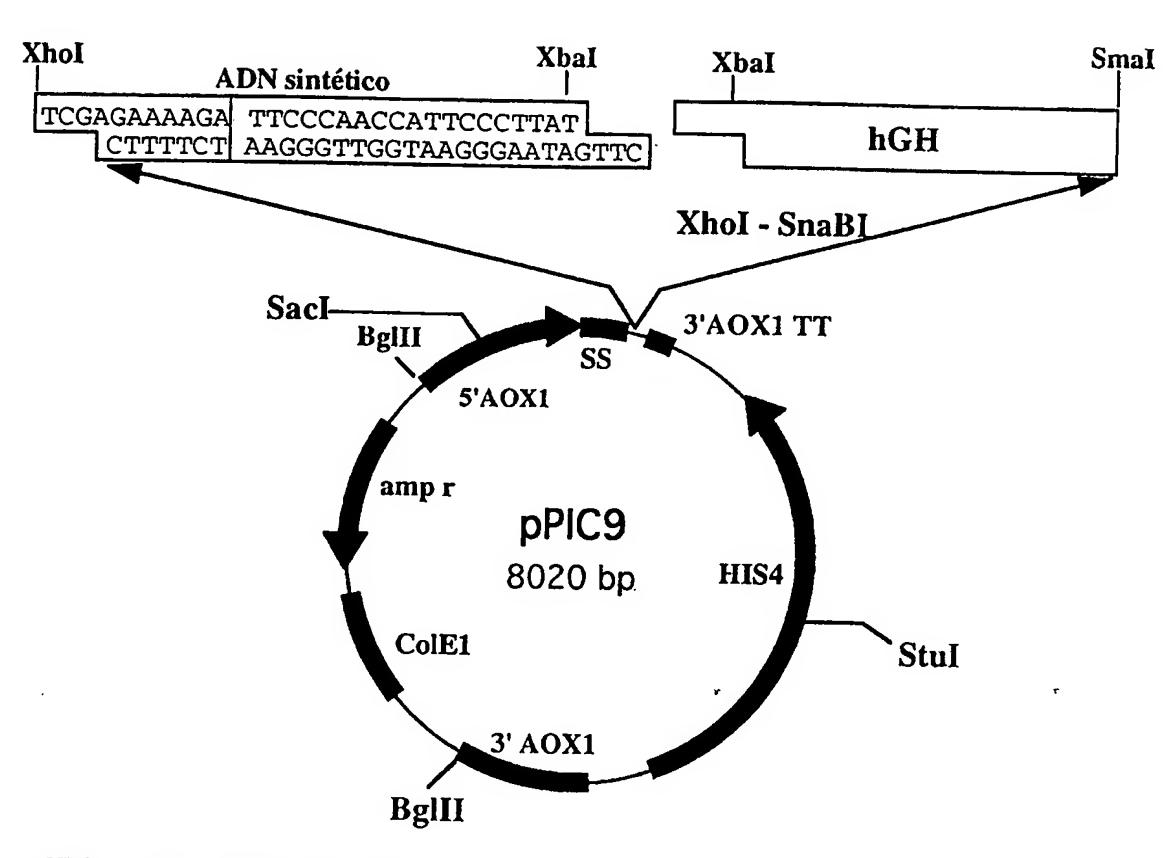


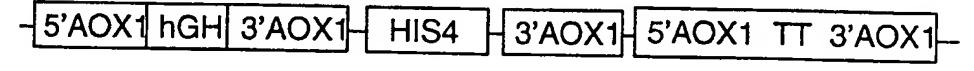
Figura 2

3/3

(A)

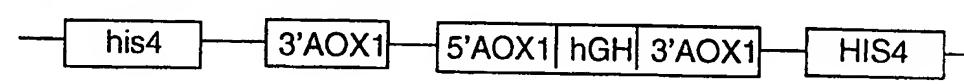


(B) Digestión con Stu I



Genoma de P. pastoris

(C) Digestión con Sac I



Genoma de P. pastoris

Figura 3



AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION

12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 USA

PCT/IIX 97/0003

Telephone: 301/231-5519 FAX: 301/816-4366

FACSIMILE

REC'D 09FEB 1938
WIPO PCT

Date:

November 8, 1996

To:

Dra. Martha Guerrero de Viader and

Dr Hugo A. Barrera Saldana

Universidad Autonoma de Nuevo Leon

Fax Number:

011-528-333-77-47

Total number of pages including this page: One (1)

From: ATCC Patent Depository

Reference: Patent Deposit. Recombinant yeast harboring an hGH expression cassette integrated into its genome, GS115hGH22K-01 assigned ATCC 74398. Date of deposit October 22, 1996. Paperwork will be forwarded to you in a few days.

An invoice will be sent under separate cover referencing check received as follows:

One time fee - 30 years

Viability Test

Phone/Fax Charge

\$ 600.00

100.00

Total amount to ATCC 74398 \$ 710.00 PAYMENT RECEIVED BY CHECK - 710.00

Balance due to ATCC 74398

5 - 0 --

Barbara M. Hailey, Administrator, ATCC Patent Depository

Telephone: 301/231-5519

The information contained in this faceimile is intended may for the use of the individual or entity named above. If the reader of this message is not the intended recipient, you are notified that any dissemination or distribution, except to the intended recipient of this communication, is prohibited. If you have received this communication in error, please call us immediately at the telephone number fisted above.



externational application No.
PCT/MX97/00033

IPC(6): US CL: According to B. FIEL Minimum de U.S.:	SSIFICATION OF SUBJECT MATTER Please See Extra Sheet. Please See Extra Sheet. International Patent Classification (IPC) or to both DS SEARCHED Commentation searched (classification system followed 536/23.1, 23.5, 24.1, 24.2; 530/399; 435/69.4, 253.1) ion searched other than minimum documentation to the	by classification symbols) 1, 254.23, 320.1 extent that such documents are included		
	ata base consulted during the international search (na Extra Sheet.			
C. DOC	UMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where app	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	BRANKAMP ET AL. Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein gh yeast Pichia pastoris. Protein Expression of anticoagulant-antimetastatic protein Expression of anticoagulant-anticoagulant-anticoagulant-anticoagulant-anticoagulant-anticoag	ilanten by the methylotropic pression and Purification.	1-27	
Y	US 4,342,832 A (GOEDDEL ET AL.) 03 August 1982, entire 1-27 document, especially Figures 1 and 3.			
Y	US 5,324,639 A (BRIERLEY ET document, especially Figures 2 and 4 column 11.	•	1-27	
X Furth	er documents are listed in the continuation of Box C	See patent family annex.		
•	scial categories of cited documents:	"T" later document published after the inte date and not in conflict with the appl	ication but cited to understand	
B ear. *L* doc cite ape	cument defining the general state of the art which is not considered be of particular relevance. clier document published on or after the international filing data cument which may throw doubts on priority claim(s) or which is set to establish the publication date of another citation or other scial reason (as specified).	"X" document of particular relevance; the considered movel or cannot be considered when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the considered to involve an inventive combined with one or more other such being obvious to a person skilled in the	e claimed invention cannot be red to involve an inventive step e claimed invention cannot be step when the document is a document, such combination	
being obvious to a person skilled in the art "P" document published prior to the international filing date but later than "A" document member of the same patent family				
	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sea	irch report	
17 MARC	•	1 3 APR 1998		
Commission Box PCT Washington	nailing address of the ISA/US ner of Patents and Trademarks 1, D.C. 20231	CLAIRE M. KAUEMAN Telephone No. (703) 308-0196	Doller for	



- mational application No.
PCT/MX97/00033

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,102,789 A (SIEGEL ET AL.) 07 April 1992, entire document, especially columns 3, 4, and 10.	1-27
A	EP 0344459 A2 (PHILLIPS PETROLEUM COMPANY) 06 December 1989, entire document, especially lines 1-35 of page 8.	1-27
		• •



emational application No. PCT/MX97/00033

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. X Claims Nos.: 3, 4, 5 (in part) because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Please See Extra Sheet.
· ·
3. X Claims Nos.: 5 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(s).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/MX97/00033

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: IPC (6):

C07K 14/16; C12N 1/19, 15/09, 15/10, 15/18, 15/63, 15/64, 15/65, 15/67, 15/81; C12P 1/02, 21/02

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL:

536/23.1, 23.5, 24.1, 24.2; 530/399; 435/69.4, 253.11, 254.23, 320.1

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, STN (MEDLINE, EMBASE, CAPLUS, INPADOC)

search terms: methylotrop?, yeast?, cervisi?, pastoris?, alpha(1w)factor, amf, pre-pro, proteolytic?, human growth hormone, olazaran, guerrero m, leal j, saldana h, salvado j

BOX I. OBSERVATIONS WHERE CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE

2. Where no meaningful search could be carried out, specifically:

Claims 3-5 are unsearchable to the extent that they require reference to the specified sequences. Because Applicant has not furnished a paper copy and machine readable form of the sequence listing as required by PCT Rule 5.2, no meaningful search of the sequence per se can be carried out by this Authority. However, the subject matter of the claims has been searched to the extent possible with reference to the balance of the description.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/MX97/00033

u 😘

A. CLASIF	A. CLASIFICACION DE LA INVENCION				
CIP ⁶ : ver hoja suplementaria					
Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC					
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA					
Documentació	on mínima consultada (sistema de clasificación seguido de	los símbolos de clasificación)			
U.S. :	536/23.1, 23.5, 24.1, 24.2; 530/399; 435/69.4, 253.1	1, 254.23, 320.1			
	ntación consultada además de la documentación mínima, s por la búsqueda	en la medida en que tales documento	os formen parte de los sectores		
utilizados)	electrónica consultada durante la búsqueda internacional (no ver hoja suplementaria	ombre de la base de datos y, cuando sea a	aplicable, términos de búsqueda		
C. DOCUN	MENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES				
Categoría*	Identificación del documento, con indicació de los pasajes pertiner		Nº de las reivindicaciones pertinentes		
	BRANKAMP ET AL. Expression of sy anticoagulant-antimetastatic protein ghila yeast Pichia pastoris. Protein Expression Diciembre 1995. Volumen 6, página mente figura 2 y página 816, seguina esta esta esta esta esta esta esta est	nten by the methylotropic ression and Purification. s 813-820, especial-			
Y	US 4,342,832 A (GOEDDEL ET AL. (03.08.82), todo el documento, es y 3.)3 Agosto 1982 specialmente figuras 1	1-27		
Y	US 5,324,639 A (BRIERLEY ET AI (28.06.94), todo el documento, es y 4, y el último párrafo entero d	pecialmente figuras 2	1-27		
	a continuación del Recuadro C se relacionan mentos adicionales.	Véase el Anexo de la famili	a de patentes.		
* Catego "A" docum conside "E" docum o con "L" docum priorid cita o "O" docum una ex	prias especiales de documentos citados: dento que define el estado general de la técnica que no se dera como particularmente pertinente dento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional posterioridad a la misma dento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de lad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra por una razón especial (como la especificada) dento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a ento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a ento publicado antes de la fecha de presentación internacional, con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada	presentación internacional o de procon la solicitud, pero que se cita teoría que constituye la base de "X" documento de particular importar puede considerarse nueva o no actividad inventiva cuando se co "Y" documento de especial importar invención reivindicada implique documento esté combinado co combinación sea evidente para esta esta constituidad esta esta esta esta esta esta esta esta	nncia; la invención reivindicada no puede considerarse que implique onsidera el documento aisladamente ncia; no puede considerarse que la ue actividad inventiva cuando el n otro u otros documentos, cuya un experto en la materia		
Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional					
internacion		13 Abril 1998 (13.0			
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Funcionario autorizado búsqueda internacional					
Facsimil N	ISA/US	Teléfono N°			



Solicitud internacional N°

PCT/MX97/00033

C (Continua	ción). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES	•
Categoria*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	US 5,102,789 A (SIEGEL ET AL.) 7 Abril 1992 (07.04.92) todo el documento, especialmente columnas 3, 4, y 10.	1-27
A	EP 0344459 A2 (PHILLIPS PETROLEUM COMPANY) 6 Diciembre 1989 (06.12.89), todo el documen- to, especialmente l ineas 1-35 de la página 8	1-27
	*	F



Eolicitud internacional N° PCT/MX 97/00033

Recuadro I Observaciones cuando no han podido efectuarse búsquedas sobre ciertas reivindicaciones (continuación del punto 1 de la primera hoja)
Este informe de búsqueda internacional no se ha establecido respecto de ciertas reivindicaciones, en virtud del Artículo 17.2)a), por las razones siguientes:
1. Reivindicaciones Nos.: debido a que se refieren a objetos para los que no se ha solicitado a esta Administración su búsqueda, concretamente:
2. Reivindicaciones Nos.: 3, 4, 5 (en parte) debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con las exigencias prescritas, de forma que no puede realizarse una búsqueda internacional significativa, específicamente:
Reivindicaciones Nos.: 5 debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4.a).
Recuadro II Observaciones cuando falta la unidad de la invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)
La Administración encargada de la búsqueda internacional ha encontrado invenciones múltiples en esta solicitud internacional, como se indica a continuación:
1. Debido a que todas las tasas adicionales de búsqueda exigidas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones para las que puede efectuarse la búsqueda.
2. Debido a que puede efectuarse la búsqueda respecto de todas las reivindicaciones susceptibles de búsqueda sin esfuerzo que justifique una tase adicional, esta Administración no invita a pagar ninguna tasa adicional.
Debido a que sólo algunas de las tasas adicionales de búsqueda requeridas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca únicamente las reivindicaciones para las que fueron pagadas las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. El solicitante no pagó en su momento las tasas adicionales de búsqueda requeridas. En consecuencia, este informe de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; abarca las reivindicaciones Nos.:
Observación sobre protesta Las tasas de búsqueda adicional fueron acompañadas por protesta del solicitante. Ninguna protesta acompañó al pago de las tasas de búsqueda adicional.

A. CLASIFICACION DEL OBJETO:

CIP(6):

C07K 14/16; C12N 1/19, 15/09, 15/10, 15/18, 15/63, 15/64, 15/65, 15/67, 15/81; C12P 1/02, 21/02

A. CLASIFICACION DEL OBJETO:

US CL:

536/23.1, 23.5, 24.1, 24.2; 530/399; 435/69.4, 253.11, 254.23, 320.1

B. CAMPOS DONDE SE HA EFECTUADO LA BUSQUEDA:

Bases de datos electrónicas consultadas (nombre de la base de datos y terminos utilizados:

APS, STN (MEDLINE, EMBASE, CAPLUS, INPADOC)

terminos buscados: methylotrop?, yeast?, cervisi?, pastoris?, alpha(lw)factor, amf, pre-pro, proteolytic?, human growth hormone, olazaran, guerrero m, leal j, saldana h, salvado j

RECUADRO I. OBSERVACIONES CUANDO SE ESTIMA QUE ALGUNAS REIVINDICACIONES NO PUEDEN SER OBJETO DE BUSQUEDA

2. No pudo efectuarse una búsqueda provechosa concretamente:

Las reivindicaciones 3 a 5 no han podido ser objeto de búsqueda ya que requieren referencias a las sequencias especificadas. Dado que el solicitante no ha sometido una lista de las sequencias sobre papel y legible por máquina como lo requiere la Reyla 5.2 del PCT, esta Administración no puede efectuar una búsqueda provechosa de la sequencia per se. Sin embargo, las reivindicaciones han sido objeto de una búsqueda en todo cuanto ha sido posible con referencia al resto de la descripción.